環境技術実証モデル事業

化学物質に関する簡易モニタリング技術分野

化学物質に関する簡易モニタリング技術
実証試験計画書

環境技術開発者	株式会社ホリバ・バイオテクノロジー
技術・製品の名称	《技術名》　ELISA法（酵素免疫測定法） 《製品名》　ビテルタノール測定キットE

平成１７年１０月

鳥　取　県

はじめに

本実証試験計画書は、「化学物質に関する簡易モニタリング技術　実証試験要領第２版（平成１７年５月１６日　環境省総合環境政策局）」（以下、「実証試験要領」という。）に基づいて選定された実証対象技術について、実証機関及び環境技術開発者の２者が協議、合意の上、実証試験要領に準じて策定したものである。

（実証機関）
鳥取県生活環境部衛生環境研究所
所　長　　杉　本　雅　美

（環境技術開発者）
株式会社ホリバ･バイオテクノロジー
代表取締役社長　河　野　猛

目　次

１．実証試験の概要と目的 …… １
1.1 実証試験の概要と目的 …… １
1.2 実証試験の視点 …… １
２．実証試験の参加組織と実証試験参加者の責任分掌 …… ２
2.1 実証試験の参加組織 …… ２
2.2 実施体制 …… ２
2.3 実証試験参加者の責任分掌 …… ３
３．実証試験の対象とする化学物質簡易モニタリング技術の概要 …… ４
3.1 実証対象技術の原理 …… ４
3.2 実証対象製品のデータ …… ４
４．実証試験のデザイン …… ５
4.1 実証試験の期間 …… ５
4.2 実証試験の内容 …… ６
4.3 実証対象製品の受け入れと管理 …… ７
4.4 実証試験の方法 …… ９
（1）基本的な性能試験 …… １０
①測定範囲試験 …… １０
②検出下限及び定量下限試験 …… １０
③繰返し再現性試験 …… １０
④日間再現性試験 …… １１
⑤期間再現性試験 …… １１
⑥プレート間再現性試験 …… １１
⑦交差反応性試験 …… １１
（2）実用的な性能試験 …… １２
①回収特性試験 …… １２
②測定精度試験 …… １２
５．データの品質管理 …… １３
６．データの管理、分析、表示 …… １３
７．監査 …… １３
８．評価 …… １３

付録０：取扱説明書

付録１：技術仕様書

付録２：自社による性能試験結果

付録３：参考となるその他の文書やデータ等

１．実証試験の概要と目的

１.1 実証試験の概要と目的

既に適用可能な段階にありながら、環境保全効果等についての客観的な評価が行われていないために普及が進んでいない先進的環境技術について、その環境保全効果等を第三者が客観的に実証する事業をモデル的に実施することにより､環境技術実証の手法･体制の確立を図るとともに、環境技術の普及を促進し、環境保全と環境産業の発展に資することを目的とするものである。

本実証試験は、平成１７年５月１６日　環境省総合環境政策局が策定した実証試験要領に基づいて選定された実証対象技術について、同実証試験要領に準拠して実証試験を実施することで、製品性能の信頼性等を客観的に実証するものである。

本実証試験の化学物質簡易モニタリング技術とは、操作・管理の容易性や定量の高感度化などの特徴をもったもので、スクリーニング的な活用や簡易な方法で異常値を監視できることなどへの有用性が期待できるものを指すものとする。

対象とする技術は、一般環境モニタリングでの利活用の可能性を念頭に、抗原抗体反応を応用した酵素標識免疫測定法（ＥＬＩＳＡ法）による簡易分析技術とする。

1.2 実証試験の視点

本実証試験では、以下の視点から実証を行うものとする。

○　製品性能の信頼性

○　一般環境モニタリングでの実用性

○　製品操作等の簡便性

２．実証試験参加組織と実証試験参加者の責任分掌

2.1 実証試験参加組織

実証試験に参加する組織は、下表に示すとおりである。

表 2.1　実証試験参加組織

実証機関	団体名	鳥取県生活環境部衛生環境研究所
	住所	〒682-0704　鳥取県東伯郡湯梨浜町南谷526-1
	担当者所属・氏名	食品衛生室　室長　筧　一郎
	電話番号	0858-35-5411
	FAX 番号	0858-35-5413
	E-mail アドレス	kakehii@pref.tottori.jp
環境技術開発者	企業名	株式会社ホリバ・バイオテクノロジー
	住所	〒601-8315　京都市南区吉祥院車道町48番地
	担当者所属・氏名	試薬事業部開発・製造部　伊東　茂壽
	電話番号	075-692-1786
	FAX 番号	075-692-1790
	E-mail アドレス	Shigekazu.ito@horiba.com

2.2 実施体制

実証試験の実施体制は、下図に示すとおりである。

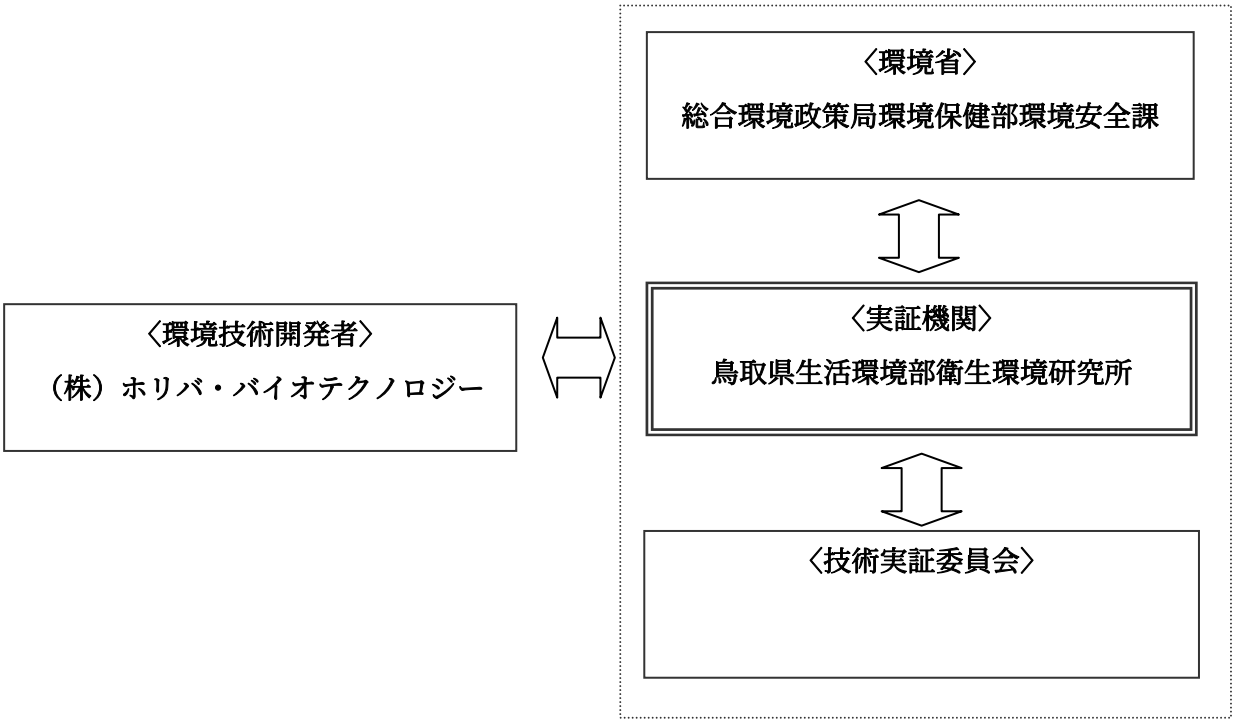

図 2.2　実証試験の実施体制

2.3 実証試験参加者の責任分掌

実証試験参加者とその責任分掌は、下表に示すとおりである。

表 2.3　実証試験参加者の責任分掌

実証試験参加機関	責任分掌	参加者	
		部署	氏名
実証機関	実証試験の全体の総括責任者	所長	杉本　雅美
	実証試験における ELISA 法の総括責任者	食品衛生室長	筧　　一郎
	実証試験における ELISA 法担当者のリーダー	食品衛生室 研究員	山根　一城
	実証試験における ELISA 法担当者	保健衛生室 研究員	金田　聡子
	実証試験における機器分析の総括責任者	食品衛生室長	筧　　一郎
	実証試験における機器分析担当者のリーダー	食品衛生室 研究員	山根　一城
	実証試験における機器分析担当者	水環境室 研究員	奥田　益算
	実証試験における機器分析担当者	食品衛生室 研究員	池井　和世
	実証試験における品質管理者	技術次長	八幡　正雄
	実証試験における品質管理担当者（内部監査員）	保健衛生室長	井田　正巳
	実証試験における品質管理担当者（内部監査員）	環境化学室 特別研究員	牧田　尊弘
環境技術開発者	実証対象製品全体の総括責任者	開発・製造部 部長	伊東　茂壽
	実証対象製品の提供	開発・製造部 次長	門脇　篤
	実証対象製品の取扱説明書等の提供	開発・製造部 部長	伊東　茂壽
	実証試験実施上の参考情報の提供	開発・製造部 次長	門脇　篤

３．実証試験の対象とする化学物質簡易モニタリング技術の概要

3.1 実証対象技術の原理

この実証対象製品は、ビテルタノールに対する特異的なモノクローナル抗体を応用した、環境水のビテルタノール測定 ELISA キットである。

ELISA の原理は、競合反応（測定対象物質濃度が高い試料では吸光度が低く、濃度が低い試料では吸光度が高い）で、マイクロプレート（96 ウェル）を使用したキットである。

3.2 実証対象製品のデータ

環境技術開発者より提出された実証対象製品のデータは、下表に示すとおりである。

表 3.2　実証対象製品のデータ（1）

項目	記　入　欄
製品名	ビテルタノール測定キット E
型番	EL106－01
販売・製造元	株式会社　ホリバ・バイオテクノロジー
重量（キット一式、g）	350g
価格（円）	99,750 円
分析対象物質	ビテルタノール
対象環境媒体	(水質)・底質・生物・その他（　　）
利用用途	環境水その他の水質モニタリング
標準試薬・種類	(付属)（調製済／(調製要)）
操作環境（室温）	常温（15～25℃）
製品保管条件	2℃～8℃
製品保証期間	製造後 7 ヶ月間
同時測定数（最多）	46 試料
測定時間	2～3 時間

表 3.2　実証対象製品のデータ（2）

項目	記　入　欄
１．基本的な性能	
①測定範囲	9～50　ppb　（付録１）
②検出下限及び定量下限	
③繰返し再現性	標準偏差：1.9～2.3　変動係数　5.9～9.0%　（付録１）
④日間再現性	標準偏差：1.1～2.9　変動係数　3.8～15.5%　（付録２）
⑤期間再現性	保存安定性　（付録２）
⑥プレート間再現性	
⑦交差反応性	交差率：13.9%（トリアジメノール）　（付録２）
⑧その他	
２．実用的な性能	
①回収特性	112.3～129.3%（ほうれんそう）　（付録２）
②測定精度等	
③その他	
試験責任者	伊東　茂壽
試験年月日	平成１５年１２月２７日

４．実証試験のデザイン

4.1 実証試験の期間

実証試験の期間は、平成 17 年 11 月中旬～平成 17 年 12 月下旬とする。また、その期間のスケジュール（予定）は、下表に示すとおりである。

表 4.1　実証試験のスケジュール（予定）

	9月	１０月	１１月			１２月			2月	3月
	7日	3日	2週	3週	4週	1週	2週	3週	1週	3週
実証試験計画の策定										
対象技術の選定、計画書案作成	○									
実証試験計画書策定、承認		○								
実証試験の実施										
測定範囲の検討				○						
検出限界及び定量限界の検討				○						
繰返し再現性の検討				○						
日間再現性の検討				○						
期間再現性の検討				○				○		
プレート間再現性の検討				○						
交差反応性の検討					○					
回収特性の検討						○	○			
測定精度の検討						○	○			
監査の実施					○	○	○			
実証試験結果取りまとめ						○	○	○		
実証試験中間報告								○		
技術実証委員会の実施		○	○					○	○	
報告書の提出										○

4.2 実証試験の内容

実証試験項目の内容は、表 4.2 のとおりである。

表 4.2 実証項目の内容

項目	内容
１．基本的な性能	
(1)測定範囲	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いた ELISA 測定値の変動等に基づき、数値的な設定の妥当性を実証する。
(2)検出下限及び定量下限	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて同一条件での同一操作の繰返しによる ELISA 測定値の標準偏差に基づき、数値的な設定の妥当性を実証する。
(3)繰返し再現性	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて同一条件での同一操作の繰返しによる ELISA 測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を実証する。
(4)日間再現性	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて異なる条件（日付）での同一操作による ELISA 測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を実証する。
(5)期間再現性	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて製造後一定期間経過した製品の操作による ELISA 測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を実証する。
(6)プレート間再現性	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて異なるロットや異なるプレート間での ELISA 測定値の変動等に基づき、再現性の妥当性を実証する。
(7)交差反応性	提出書類の内容、市販標準品で調製した試験用試料（濃度既知）を用いて類似物質別の ELISA 測定値の相違等に基づき、交差反応性を実証する。
２．実用的な性能	
(1)回収特性	提出書類の内容、環境試料を模擬し市販標準品で混合調製した試験用試料（濃度既知）を用いた ELISA 測定値の比較に基づき、回収特性を実証する。
(2)測定精度	環境試料（濃度未知）を用いた ELISA 測定値の変動や操作手順・操作方法の特徴等に基づき、測定精度、前処理妥当性、操作簡便性等による環境試料への適用性を実証する。

4.3 実証対象製品の受け入れと管理

（1）実証対象製品（ELISA キット）の受け入れ

受領の記録を ELISA キット管理表（様式 4.3）に記入し、以下の事項を確認する。

〇管理表と ELISA キットの品名、数量が一致していること。

〇ELISA キットの搬送が適切に取り扱われていること。

〇ELISA キットに不適合又は疑義を発見したときは、適切な処置をとる。

（2）ELISA キットの管理

〇ELISA キットは、変質しないように、取扱説明書に記載された保管条件で適切に保管・管理する。

〇ELISA キットの分割を行う場合は、汚染や品質低下のない方法で行い、識別番号等必要な表示を行うとともに、分割の年月日その他必要な事項を管理表に記録する。

ELISA キット管理表（様式 4.3）

受領年月日　　時　　分

番号（管理番号）　　－

メーカー名

品名

Lot. No.

搬入時確認事項

□　包装等に破損がない　　保管場所

□　保管温度（　　℃）　　保管温度

□　搬入時の温度管理

□　使用期限

□　その他異常なし

担当者

（移動・分割等の記録）

番号（管理番号）　　－

メーカー名

品名

Lot. No.

搬入時確認事項

□　包装等に破損がない　　保管場所

□　保管温度（　　℃）　　保管温度

□　搬入時の温度管理

□　使用期限

□　その他異常なし

担当者

（移動・分割等の記録）

4.4 実証試験の方法

基本的な性能試験及び実用的な性能試験において、以下の操作は共通である。

ア．製品の操作

製品の操作にあたっては、製品の取扱説明書を遵守するとともに、「品質管理マニュアル」に規定したELISA法（ビテルタノール）の試験操作手順（一般的な事項）に従って行う。

イ．検量線作成用標準溶液の調製

キットに付属するビテルタノール標準試薬を用い、キットが指定する調整方法で、濃度系列（以下、指定濃度系列）を作成する。

ウ．吸光度の測定

吸光度は、マイクロプレートリーダー（TECAN社製スペクトラサーモ）で測定し、指定濃度系列及び各試験用試料溶液の吸光度とする。

エ．検量線の作成

波長450nm においてプレート毎に同時に測定したゼロブランク（BLK：添付の希釈液等）及び標準溶液指定濃度系列の吸光度（３重測定の平均値）から、４-parameter logistic fitting後、検量線を作成する。

オ．実測濃度の算出

前項で作成した検量線を用いて、各試験用試料溶液の吸光度から各実測濃度を算出する。

（1）基本的な性能試験

実証対象製品の基本的な性能を検討するため、製品仕様の信頼性等の観点から市販標準品（以下、市販標準物質）で調製した試験用試料溶液を用いた実証試験を行う。

○　試験用試料溶液の調製

ビテルタノールの市販標準物質（和光純薬製ビテルタノール標準品（残留農薬試験用））を用いて、10%メタノールを希釈溶媒として、試験用試料溶液を調製する。

標準溶液指定濃度系列及び試験用試料溶液の調製濃度は、表 4.4.1 のとおりである。

表 4.4.1　標準溶液指定系列及び試験用試料溶液

試験項目	物質名	試料溶液調製濃度
標準溶液指定濃度系列	ビテルタノール	0，5，15，30，50μg/L
①測定範囲 ④日間再現性 ⑤期間再現性 ⑥プレート間再現性	ビテルタノール	0，5，15，30，50μg/L
②検出下限及び定量下限	ビテルタノール	5μg/L
③繰返し再現性	ビテルタノール	15μg/L
⑦交差反応性	トリアジメノール トリアジメホン	0,1,10,100,1000 μg/L 0,10,20,50,100 mg/L

①　測定範囲試験

調製した試験用試料溶液を用いて、各調製濃度につき３重測定を行い、３個の吸光度それぞれから求めた実測濃度より、平均値、標準偏差、変動係数を求める。

これを基に、各調製濃度と実測濃度との比較、変動係数から指定された測定範囲の妥当性について検討する。

②　検出下限及び定量下限試験

測定範囲の下限付近に調製した試験溶液を 8 回測定し、その実測濃度より標準偏差（SD）を求める。求めた SD から 3SD 及び 10SD をそれぞれ検出下限及び定量下限とし、申請データと比較検討する。

③　繰返し再現性試験

測定範囲の直線域に調製した試料溶液を3重測定で8回測定し、３重測定の平均吸光度から算出した8個の実測濃度より平均値、標準偏差、変動係数を求める。

求めた変動係数（n=8）から、繰返し再現性について検討する。

④　日間再現性試験

同一測定者が 1 週間の異なる 3 日間において、同一ロットの異なるプレートを用いて「①測定範囲試験」と同じ測定操作を行う。各調製濃度について得られた実測濃度の変動係数を求め、3 日間の比較から日間再現性について検討する。

⑤　期間再現性試験

同ロット（製造年月日が同じ）の２枚のプレートを用いて、1 ヶ月以上離れた時期に「①測定範囲試験」と同じ測定操作を行う。各調製濃度について得られた実測濃度の変動係数を求め、プレート間の比較から期間再現性について検討する。

⑥　プレート間再現性試験

同一ロット 2 プレート及び異なるロット 1 プレートの 3 プレートを用いて、同日に「①測定範囲試験」と同じ測定操作を行う。各調製濃度について得られた実測濃度の変動係数を求め、同一ロット及び異なるロットの比較からプレート間再現性について検討する。

⑦　交差反応性試験

ビテルタノール及び類似物質(トリアジメノール、トリアジメホン）について調製した試料溶液で吸光度曲線（実測値は 3 重測定の平均値から求める）を描き、吸光度曲線から類似物質の 50%発色阻害濃度を求める。（ビテルタノールの 50%阻害濃度/類似物質の 50%阻害濃度）×100（%）で交差率を求め、類似物質の交差反応性を検討する。

類似物質に関して、調製した試料溶液のみでは 50%発色阻害濃度が求められない場合は、50%発色阻害濃度が得られるように高濃度側を加えた濃度系列を作り、試験をやり直す。予想される高濃度側の濃度範囲が実用的でない場合には、20 または 10%阻害濃度で代用する。

（2）実用的な性能試験

実証対象製品の実用的な性能を検討するため、環境試料への適用性等の観点から環境試料試験による実証試験を行う。

① 回収特性試験

グラスファイバーフィルター（GFC：孔径 1.2μm）を用いて、河川水をろ過したろ液を原水とし、それに測定範囲の中央付近となるように市販標準物質（ビテルタノール）を添加するとともに、妨害物質としてフミン酸ナトリウムを一定濃度添加して、試験用試料溶液を調製する。試験用試料溶液の調製濃度（添加濃度）は、表 4.4.2 のとおりである。

調製した試験用試料溶液について、３重測定した実測濃度から平均値、回収率を求め、フミン酸ナトリウムに対する製品の回収特性を検討する。

表 4.4.2 試験用試料溶液

物質名	試料溶液調製濃度
分析対象物質：ビテルタノール	15μg/L
妨害物質：フミン酸ナトリウム	0，1，5，10，50 mg/L

② 測定精度試験

３地点から採取した河川水について、グラスファイバーフィルターによるろ過及び固相カートリッジを用いた固相抽出法による前処理を行って測定する。

同一河川水について、所定のマニュアル（前処理法を含む）に従って機器分析を行い、ELISA 法と機器分析法の実測値を比較し、環境試料への適用可能性について検討する。

また、製品の操作簡便性（測定時間、操作数）について、環境試料への適用性の観点から検討する。

５．データの品質管理

実証試験は、「品質管理マニュアル」に従って行い、作成した文書及び記録については、適切に保管・管理する。

６．データの管理、分析、表示

（１）データの管理

実証試験で得られたデータは、「品質管理マニュアル」従い識別し、適切に収集し、見出し付け、ファイリングし、10 年間維持した後、廃棄するものとする。

（２）データの分析と表示

実証試験で得られたデータは、必要に応じて統計処理を行うとともに、使用した数式を実証試験結果報告書に記載する。

７．監査

実証試験が適切に実施されていることを確認するために実証試験の期間中に１回以上「品質管理マニュアル」に従い監査を実施する。

８．実証試験の評価

実証試験結果の評価は、3.2 実証対象製品のデータと本実証試験結果を比較し評価する。

なお、3.2 実証対象製品のデータがないものについては、ELISA 法による一般的な製品のデータを参照して評価する。

また、「実用的な性能試験」結果については、環境試料への適用性等の観点から評価する。

付録０：取扱説明書

研究用試薬

スマートアッセイ シリーズ

ビテルタノール測定キットＥ

Ver 1

１．はじめに

本品は、従来の機器分析法とは全く異なる原理、抗ビテルタノール抗体の特異的反応を利用した酵素免疫測定法（Enzyme‐Linked Immunosorbent Assay；ELISA）によるビテルタノールの測定キットです。測定に必要な全ての試薬をパッケージしており、煩雑な試薬調製の必要がなく、測定したい時にすぐにお使いいただけます。

２．測定原理

本キットは、環境水中のビテルタノールを直接競合ELISA法で測定するものです。

ビテルタノールと特異的に反応する抗体を固相化したマイクロプレートに、ビテルタノール（標準溶液または試料溶液）とビテルタノール酵素標識物溶液の等量混合液を加えて競合反応させます。反応終了後、未反応物を洗浄除去し発色試薬を加えると、固相化抗体に結合した酵素標識物の酵素反応によって発色試薬中のテトラメチルベンジジンが酸化され、発色します。発色反応を発色停止試薬で停止させた後、450 nmの吸光度を測定します。吸光度は、標準溶液または試料溶液中のビテルタノール濃度が高いほど低下します。標準溶液のビテルタノール濃度とその吸光度の関係からビテルタノール濃度を求めます。

３．測定キットの特徴

1)**高感度**－ビテルタノールを 9～50 ppb の範囲で測定できます。
2)**簡便**－機器分析法に比べ試料の煩雑な前処理を必要とせず、簡易な操作で測定できます。
3)**迅速**－前処理が簡単なため、短時間で多くの試料を同時に測定できます。
4)**低コスト**－高価な機器を必要とせず、測定場所を特に選ばないため、コストを安くできます。

４．測定キットの構成

１キットに含まれる試薬の内訳は、第１表の通りです。

第１表　キットの構成

	品名	容量	剤型	数量
①	ビテルタノール抗体プレート	８ウエル×12 列（96 ウエル）	乾燥品	１枚
②	ビテルタノール標準試薬 C1（ 9 ppb）	1 mL	凍結乾燥品	2 バイアル
③	ビテルタノール標準試薬 C2（15 ppb）	1 mL	凍結乾燥品	2 バイアル
④	ビテルタノール標準試薬 C3（30ppb）	1 mL	凍結乾燥品	2 バイアル
⑤	ビテルタノール標準試薬 C4（60ppb）	1 mL	凍結乾燥品	2 バイアル
⑥	ビテルタノール酵素標識物試薬	6 mL	液状品	1 バイアル
⑦	洗浄試薬（10 倍濃縮）	50 mL	液状品	1 バイアル
⑧	発色試薬	13 mL	液状品	1 バイアル
⑨	発色停止試薬	13 mL		1 バイアル
⑩	プレートシール			１枚

５．測定に必要な材料・装置

（１）試薬
①ビテルタノール測定キットＥ：ホリバ・バイオテクノロジー社製
②精製水
③メタノール：環境分析用
④10%メタノール：精製水を用いて 10 倍希釈

（２）器具
①マイクロピペット（50～200 μL,1000 μL）および専用チップ
②メスシリンダー：500 mL
③試験管：ガラス製、10 mL
④ホールピペット：ガラス製
⑤メスフラスコ：ガラス製
⑥ガラス繊維フィルター（ADVANTEC 社製 GLASS FIBER FILTER GA-55 または同等品）

（３）装置
①ストップウォッチ：秒単位まで表示
②試験管ミキサー
③マイクロプレートリーダー:スマートリーダー(ホリバ・バイオテクノロジー社製)
④マイクロプレート洗浄機:スマートウォッシャー(ホリバ・バイオテクノロジー社製)

６．　溶液の調製

（１）ビテルタノール抗体プレート
そのまま用います。

（２）ビテルタノール標準溶液
ビテルタノール標準試薬C1、C2、C3およびC4に10%メタノール１ mLをマイクロピペットで加えて溶解し、それぞれビテルタノール標準溶液C１からC４とします。溶解後の濃度は、それぞれ9、15、30および60 ppbです。

（３）ビテルタノール酵素標識物溶液
酵素標識物試薬に精製水6 mLを加えて溶解し、ビテルタノール酵素標識物溶液とします。

（４）洗浄溶液
洗浄試薬に、精製水450 mLをメスシリンダーで加えて希釈し、洗浄溶液とします。

（５）発色試薬
そのまま用います。
（６）発色停止試薬
そのまま用います。

７．測定操作

１）測定方法

ろ 過

試料をガラス繊維フィルター等を用いてろ過し、メタノール 10%溶液を調製します。

混合液の調製

ビテルタノール標準溶液または試料溶液 150μL をマイクロピペットで試験管に取り、それぞれにビテルタノール酵素標識物試液 150μL をマイクロピペットで加えて混合し、標準混合液または試料混合液とします。

競合反応

抗体プレートのウェルに、標準混合液または試料混合液 100 μL ずつをマイクロピペットで分注します。ついで、ストリップの使用ウェルに合わせて切断したプレートシールを貼り、室温(15～25℃)で１時間反応させます。
※専用のマイクロプレートリーダー“スマートリーダー”を用いて測定を行う場合は、標準混合液の配置が決まっていますので、リーダーの取扱説明書に従って使用して下さい。

プレートの洗浄

反応液を吸引除去し、洗浄試液 300 μL で 3 回洗浄します。
※ウェルの底に洗浄溶液が残っていないことを確認して下さい。
※測定の迅速性と定量精度を高めるため、専用の洗浄機のご使用をお勧めします。

発色反応､発色反応停止

マイクロピペットで発色試薬 100 μL を加えて室温(15～25℃)で 10 分間反応させた後、発色停止試薬 100 μL をマイクロピペットで添加して下さい。
※発色試薬を加えると時間と共に青色に、発色停止試薬を加えると瞬時に黄色に呈色します。
※各ウェルの発色反応時間が一定になるように注意して下さい。

吸光度測定

波長 450 nm における吸光度を、マイクロプレートリーダーにより測定します。
※吸光度測定は発色反応停止後、15分以内に行って下さい。
※“スマートリーダー”を使用いただくことにより、煩雑な濃度計算が自動的になされ、表示されます。

２）試料中のビテルタノール濃度の計算

回帰式によって算出します。リーダーに付属している演算ソフト等により回帰式を求め、濃度を算出して下さい。式のＹに試料の吸光度を代入しビテルタノール濃度（Ｘ）を求めることができます。専用のマイクロプレートリーダー“スマートリーダー”を用いて算出した回帰曲線と式を例として第１図に示します。

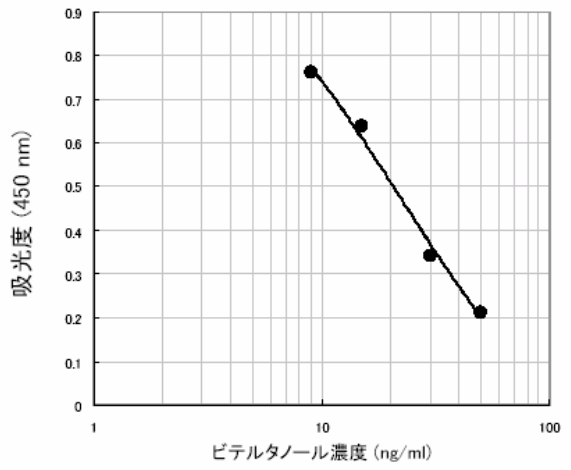

図１　回帰曲線および回帰式の例

８．測定キットの反応特性

本キットに用いている抗体の各種農薬に対する交差反応性は、第２表の通りです。

第２表　各種農薬との交差反応性

農薬	商品例	交差反応性 (%)
ビテルタノール	バイコラール	100
トリアジメノール		13.9
トリアジメホン	バイレトン	＜0.1
ジニコナゾール		＜0.1
トリフルミゾール	トリフミン	＜0.1
プロピコナゾール	チルト	＜0.1
ミクロブタニル	ラリー	＜0.1
フェンブコナゾール	インダー	＜0.1
テトラコナゾール	ホクガード	＜0.1
シフルトリン	バイスロイド	＜0.1

９．貯法・有効期間

貯　　法：遮光して 2～8℃に保存します。
有効期間：パッケージの外面に表示してあります。

１０．注意事項

使用前に、取扱説明書をよくお読みいただき、注意事項をお守りください。

１）一般的な注意事項

① 本キットは、食品衛生・環境等に関わる自主検査用です。測定結果の判断と運用は、すべてお客様自身の責任で行ってください。
② 責任ある管理者の指導のもとに、保護手袋、保護メガネ等を着用して安全に取り扱って下さい。
③ 吸飲したり、皮膚と接触したりすると有害な試薬類が含まれています。身体に異常を感じた場合は、直ちに医師の手当てを受けてください。
④ 保管・廃棄する場合には、衛生面、環境面に十分配慮し、法規を遵守してください。ビテルタノールを含む廃液、発色反応停止後の液（希硫酸を含む）は回収し、環境中に廃棄しないでください。
⑤ 本キットを一度に使い切らなかった場合は、各容器を密封し、取扱説明書と共に保管してくださ

い。

２）測定操作上の注意事項

① 本キットは、使用 30 分程前に冷蔵庫から取出し、室温に戻してからご使用ください。
② 異なるロットの試薬を組合わせて使用しないでください。
③ マイクロプレートは、各 8 ウェルづつのストリップタイプになっていますので、必要なウェル数のみを用意し、残りはラミネート袋に戻し、密封して冷蔵保存してください。また、抗体プレートを取扱う際は、裏面を汚さないようにしてください。
④ 正確な分析を行うため、試薬の溶解・希釈操作は可能な限り正確に行ってください。また、各反応時間を厳守してください。
⑤ 検量線は、測定ごとに作成してください。
⑥ 測定は少なくとも 2 重測定で行ってください。
⑦ 測定は、検量線範囲内の濃度（9 ～50 ppb）で行って下さい。50 ppb を超える高濃度の測定試料の場合は、10%メタノールで追加希釈した後再測定してください。
⑧ 競合反応後の洗浄ではウェルの底に洗浄溶液が残っていないことを確認して下さい。
⑨ 発色および発色停止反応時の各ウェルの反応時間が一定になるように調整してください。
⑩ 本キットは、トリアジメノールと 13.9%の交差反応性がありますのでご注意ください。

株式会社　ホリバ・バイオテクノロジー
〒601－8315　京都市南区吉祥院車道町 48 番地
TEL.075－692－1786　FAX.075－692－1790
http://www.horiba-biotech.co.jp

付録１：技術仕様書

測定範囲の設定（ビテルタノール）

1.　検量線作成及び測定範囲の上限値と下限値の設定
1-1.目的
吸光度がBo（農薬無添加区）の20%～80%に相当する濃度を検量線から読み取り、測定範囲を設定する。

1-2.材料

キット用抗体ﾌﾟﾚｰﾄ
キット用酵素標識物試薬
検量線用標準液
発色液（TMB試薬）
発色停止液（1N 硫酸）

1-3.方法
1-3-1.抗体プレート
4℃で保管してあるキット用抗体プレートを30分間25℃に静置して、使用した。

1-3-2.酵素標識物試液の調製
4℃で保管してあるキット用酵素標識物試薬を30分間25℃に静置した。
↓
蒸留水6mLで溶解し、酵素標識物試液とした。

1-3-3.検量線溶液の調製
標準品10mgを10mLメスフラスコに入れて、メタノールでフィルアップし、
1000ppm標準品メタノール溶液を調製した。
↓
メタノールで希釈し、50ppmの検量線用標準液を調製した。
↓
検量線用標準液を下表に示すように希釈し調製した。
↓
検量線溶液の調製

		1	2	3	4	5	6
検量線用標準液	(ppm)	50	12.5	5	1.3	0.31	0
希釈後	(ppb)	500	125	50	12.5	3.1	0

試験管に4mLの10%メタノールをとり、検量線用標準液を各試験管に40μl添加して、
検量線溶液とした。

1-3-4.アッセイ
検量線溶液と酵素標識物溶液を等量混合して、混合試液とした。
↓
各混合試液を抗体プレートに100μL/well分注した。
↓
25℃　1時間静置した。
↓
吸引、洗浄３回実施した。
発色液を100μL/well分注した。
↓
発色反応　25℃　10分間静置した。
↓
反応停止
反応停止液100μL/well分注した。
↓
測定（450nm）　　※測定機：スマートリーダー

1-4.結果
（農薬添加区の吸光度）／（農薬無添加区の吸光度）の値（B/Bo）について、
B/Bo=0.8付近の濃度（測定下限；L）として9 ppb、及びB/Bo=0.2付近の濃度（測定上限；H)として50 ppbを選定して、測定範囲上限および下限を設定した。

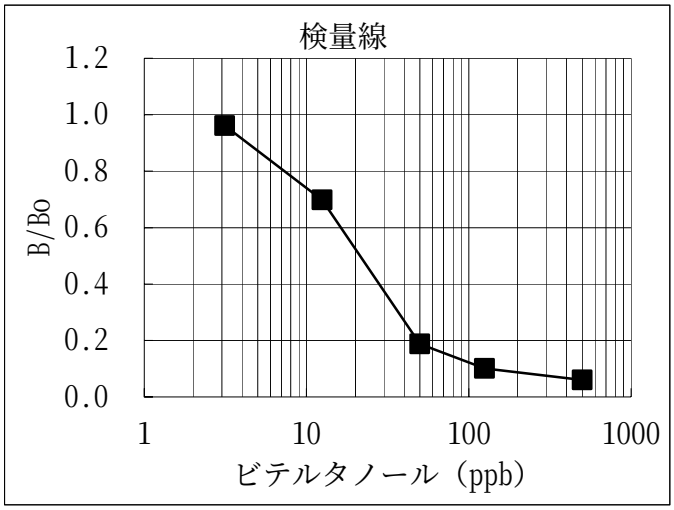

図１．ビテルタノール検量線（B/Bo表示）

付録１：技術仕様書

測定範囲の設定（ビテルタノール）

２．　有意差検定
2-1.目的
設定した測定範囲の下限値（9 ppb）と上限値（50 ppb）のBo及び試薬ブランクに
対する有意差を確認する。

2-2.材料
ビテルタノール測定キット

2-3.方法
2-3-1.キットの調製
4℃保存キットを30分間25℃に静置した。
↓
酵素標識物試薬に精製水6mLを添加、溶解して、酵素標識物試液とした。
標準試薬に10%メタノール　1.0mLを添加、溶解して標準試液（L, H）とした。

2-3-2.アッセイ
標準試液（L, H）と酵素標識物溶液、又は10%メタノールと酵素標識物溶液を等量混合して、
混合試液とした。
↓
各混合試液を抗体プレートに100μL/well分注した。
↓
25℃　1時間静置した。
↓
吸引、洗浄３回実施した。
発色液を100μL/well分注した。
↓
発色反応　25℃　10分間静置した。
↓
反応停止
反応停止液100μL/well分注した。
↓
測定（450nm）　　※測定機：スマートリーダー

2-3-3.検定方法
Boの吸光度と標準試液Lの吸光度、及び標準試液Hの吸光度と試薬ブランクの吸光度との間の
ｔ検定（等分散と仮定した2標本による検定：有意水準＝５%）を実施した。
なお、試薬ブランクは発色液と反応停止液のみを添加したものである。

2-4.結果

表1-1.
BoとLとの間の有意差検定

	Bo	L
平均	0.989125	0.7805
分散	0.00138213	0.00145343
観測数	8	8
プールされた分散	0.00141778	
仮説平均との差異	0	
自由度	14	
t	11.0813434	
P(T<=t) 片側	1.2908E-08	
t 境界値 片側	1.76130925	
P(T<=t) 両側	2.5817E-08	
t 境界値 両側	2.1447886	

表1-2.
Hと試薬ブランクとの間の有意差検定

	H	試薬ブランク
平均	0.20475	0.044
分散	0.00018479	5.05714E-05
観測数	8	8
プールされた分散	0.00011768	
仮説平均との差異	0	
自由度	14	
t	29.6368665	
P(T<=t) 片側	2.4676E-14	
t 境界値 片側	1.76130925	
P(T<=t) 両側	4.9351E-14	
t 境界値 両側	2.1447886	

BoとLのｔ検定結果
ｔ＞ｔ境界値片側　であり、BoとLとの間には有意差が認められた。

Hと試薬ブランクのｔ検定結果
ｔ＞ｔ境界値片側　であり、Hと試薬ブランクとの間には有意差が認められた。

2-5.考察
t検定からBoの吸光度とLの吸光度との間、およびHの吸光度と試薬ブランクの
吸光度との間に有意差があることから、測定範囲の設定の妥当性が確認できた。

付録２：自社による性能試験結果

再現性（ビテルタノール）

１．目的
キットの再現性（同時、日間）を確認する。

２．材料
ビテルタノール測定キット
イチゴ
1000ppm　標準品メタノール溶液

３．方法
3-1.添加用標準液の調製
1000ppm　標準品メタノール溶液
↓
メタノールを用いて下記の表の様に添加用標準液を調製した。
添加用標準液の濃度

	A	B	C
標準液（ppm）	7.69	5.13	3.85

3-2.測定試液の調製
農産物試料
↓
磨砕：農産物を細断し、ミキサーでペースト状にした。
↓
ペースト5ｇを 50mL遠沈管×３個にそれぞれ正確に量りとった。
↓
添加用標準液をそれぞれ1mLずつ添加した。
↓　　添加用標準液の濃度およびサンプル中の農薬濃度

添加試料	添加用標準液調製濃度	ホモジネート中農薬濃度	抽出・希釈後濃度
	ppm	ppm	ppb
A	7.69	1.54	30.16
B	5.13	1.03	20.12
C	3.85	0.77	15.10

↓
遠沈管のふたを閉め、よく振った。
↓
メタノール25mLを添加した。
↓
振とう機（120回/分)で30分間振とうした。
↓
綿球を詰めたシリンジでろ過した。
ろ液を標準品を添加した農産物抽出液(85%メタノール相当）とした。
↓
標準品を添加した農産物抽出液1mLをﾊﾞｲｱﾙ瓶にとり、7.5mLの蒸留水を
添加し、よく混和した。（8.5倍希釈）これを測定試液とした。

3-3.キットの調製
4℃で保管してあるキットを取り出し、30分間25℃に静置した。
↓
酵素標識物試薬に精製水6mLを添加、溶解して、酵素標識物試液とした。
標準試薬に10%メタノール　1.0mLを添加、溶解して標準試液とした。

付録２：自社による性能試験結果

3-4.アッセイ
試験管に酵素標識物試液と測定試液、又は酵素標識物試液と標準試液を等量混合し、
混合試液とした。
↓
各混合試液を抗体プレートに100μL/well分注した。
↓
25℃　1時間静置した。
↓
吸引、洗浄３回実施した。
発色液を100μL/well分注した。
↓
発色反応　25℃　10分間静置した。
↓
反応停止
反応停止液100μL/well分注した。
↓
測定（450nm）　※測定機：スマートリーダー

3-5. 同時再現性
濃度の異なる３試料を各々8点おき、各点ごとに濃度を測定して、値のばらつき具合を確認した。

3-6. 日間再現性
同一測定者が日を変えて3回行った。（８重測定）

４．結果
表2-1. 同時再現性

	測定値　(ppb)		
	試料　A	試料　B	試料　C
1	34.95	22.96	17.79
2	39.42	25.98	22.30
3	40.00	26.44	21.40
4	40.47	28.04	22.10
5	40.95	28.45	20.72
6	41.68	27.96	23.10
7	42.79	27.63	23.93
8	39.07	23.86	20.00
平均	39.92	26.41	21.42
標準偏差	2.34	2.05	1.93
変動係数(%)	5.9	7.7	9.0

表2-2. 日間再現性

	測定値　(ppb)		
	試料　A	試料　B	試料　C
1日目	38.29	25.41	19.02
2日目	37.02	24.17	15.65
3日目	39.92	26.41	21.42
平均	38.41	25.33	18.70
標準偏差	1.45	1.12	2.90
変動係数(%)	3.8	4.4	15.5

５．考察
イチゴのホモジネートにビテルタノールを添加した3試料を用いて、同時再現性および日間再現性を検討した。結果はそれぞれ表2-1および2-2に示すとおりで、同時再現性は変動係数5.9～9.0%、日間再現性は変動係数3.8～15.5%であった。他のキットに比べて変動する傾向があるので操作を慎重に行う必要がある。

付録２：自社による性能試験結果

保存安定性試験（ビテルタノール）

１．目的
キットの8℃における保存安定性を確認する。

２．材料
ビテルタノール測定キット：２ロット

３．方法
3-1.キットの調製
8℃保存キットを30分間25℃に静置した。
↓
酵素標識物試薬に精製水6mLを添加、溶解して、酵素標識物試液とした。

標準試薬に10%メタノール　1.0mLを添加、溶解して標準試液とした。

3-2.アッセイ
試験管に酵素標識物試液と標準試液及び酵素標識物試液と10%メタノールを
等量混合して、混合試液とした。
↓
各混合試液を抗体プレートに100μL/well分注した。
↓
25℃　1時間静置した。
↓
吸引、洗浄３回実施した。
発色液を100μL/well分注した。
↓
発色反応　25℃　10分間静置した。
↓
反応停止
反応停止液100μL/well分注した。
↓
測定（450nm）　　測定機：スマートリーダー

付録２：自社による性能試験結果

４．結果

4-1.1ロット目
表3-1　キットの保存安定性試験（1ロット目）

		保存日数					
		0	60	120	180	240	300
Bo	吸光度	1.148	0.890	0.958	1.057	1.060	1.009
	SD	0.034	0.006	0.045	0.039	0.032	0.027
	CV(%)	3.0	0.6	4.7	3.7	3.0	2.6
	相対値※	100.0%	77.5%	83.5%	92.1%	92.4%	88.0%
標準品L	吸光度	0.940	0.722	0.752	0.876	0.942	0.838
	B/Bo	0.819	0.811	0.785	0.829	0.888	0.830
	SD	0.021	0.022	0.015	0.023	0.026	0.039
	CV(%)	2.3	3.1	2.0	2.6	2.7	4.7
	相対値※※	100.0%	99.0%	95.8%	101.1%	108.4%	101.3%
標準品H	吸光度	0.237	0.215	0.245	0.236	0.241	0.232
	B/Bo	0.206	0.242	0.256	0.224	0.227	0.230
	SD	0.006	0.016	0.013	0.014	0.013	0.012
	CV(%)	2.6	7.3	5.5	5.7	5.2	5.2
	相対値※※	100.0%	117.2%	124.1%	108.5%	110.3%	111.5%
Boｺﾝﾄﾛｰﾙ	吸光度	1.135	0.915	1.029	1.114	1.259	1.116
	SD	0.020	0.012	0.072	0.039	0.037	0.040
	CV(%)	1.8	1.3	7.0	3.5	2.9	3.6
	相対値※	100.0%	80.7%	90.7%	98.1%	111.0%	98.3%

4-2.2ロット目
表3-2　キットの保存安定性試験（2ロット目）

		保存日数					
		0	60	120	180	240	300
Bo	吸光度	1.023	0.900	0.940	0.989	0.975	0.902
	SD	0.038	0.051	0.021	0.018	0.028	0.050
	CV(%)	3.7	5.6	2.2	1.8	2.8	5.6
	相対値※	100.0%	88.0%	91.8%	96.7%	95.3%	88.2%
標準品L	吸光度	0.799	0.703	0.726	0.774	0.809	0.705
	B/Bo	0.781	0.782	0.772	0.782	0.830	0.781
	SD	0.024	0.048	0.045	0.025	0.030	0.028
	CV(%)	3.0	6.9	6.2	3.3	3.7	3.9
	相対値※※	100.0%	100.1%	99.0%	100.2%	106.4%	100.1%
標準品H	吸光度	0.205	0.197	0.190	0.189	0.209	0.178
	B/Bo	0.200	0.219	0.202	0.191	0.214	0.197
	SD	0.004	0.014	0.014	0.007	0.017	0.008
	CV(%)	2.1	7.1	7.4	3.5	8.1	4.4
	相対値※※	100.0%	96.1%	92.7%	92.1%	101.8%	86.6%
Boｺﾝﾄﾛｰﾙ	吸光度	1.103	0.925	1.050	1.095	1.092	1.046
	SD	0.032	0.029	0.034	0.030	0.016	0.035
	CV(%)	2.9	3.1	3.2	2.7	1.4	3.4
	相対値※	100.0%	83.9%	95.2%	99.3%	99.0%	94.8%

※　0日目の吸光度を基準とした相対値
※※　0日目のB/Boを基準とした相対値

５．考察
2ロットの保存安定性試験を実施した結果、2ロットとも8℃300日保存で相対値の変動が20%以内であるので、本キットは７ヶ月使用可能である。
なお、保存試験は継続中である。

付録２：自社による性能試験結果

交差反応性（ビテルタノール）

１．目的
本キットの、類似構造農薬及び代表的農薬の交差反応性を確認した。

２．材料
ビテルタノール測定キット（標準試薬は除く）
対象農薬の標準品

1	ビテルタノール
2	トリアジメノール
3	トリアジメホン
4	ジニコナゾール
5	トリフルミゾール
6	プロピコナゾール
7	ミクロブタニル
8	フェンブコナゾール
9	テトラコナゾール
10	シフルトリン

３．方法
3-1.交差反応性測定用試液の調製
標準品をメタノールで溶解して段階希釈し希釈列を調製した。
試験管に4mLの10%メタノールをとり、希釈列を各試験管に40μl添加して、
交差反応性測定用試液とした。

3-2.キットの調製
4℃保存キットを30分間25℃に静置した。
↓
酵素標識物試薬に精製水6mLを添加、溶解して、酵素標識物試液とした。

3-3.アッセイ
試験管に酵素標識物試液と交差反応性測定用試液を等量混合し、混合試液とした。
↓
各混合試液を抗体プレートに100μL/well分注した。
↓
25℃　1時間静置した。
↓
吸引、洗浄３回実施した。
発色液を100μL/well分注した。
↓
発色反応　25℃　10分間静置した。
↓
反応停止
反応停止液100μL/well分注した。
↓
測定（450nm）　　※測定機：スマートリーダー

3-4. 交差反応性の算出
測定結果からIC_{50}値を求めたのち、交差反応性を算出した。
計算式は以下のとおりである。
交差反応性（%）＝IC_{50}値（ビテルタノール）／IC_{50}値（対象農薬）×100

付録２：自社による性能試験結果

４.結果

表4　交差反応性一覧

農薬	交差反応性(%)
ビテルタノール	100
トリアジメノール	13.9
トリアジメホン	<0.1
ジニコナゾール	<0.1
トリフルミゾール	<0.1
プロピコナゾール	<0.1
ミクロブタニル	<0.1
フェンブコナゾール	<0.1
テトラコナゾール	<0.1
シフルトリン	<0.1

５．考察

各種農薬に対する本キットの交差反応性は、表4に示す通りで、
トリアジメノールが13.9%である以外は交差反応性を示さなかった。

付録２：自社による性能試験結果

添加回収試験（ビテルタノール）

１．目的
農産物に添加したビテルタノールの回収率を確認する。

２．材料
ビテルタノール測定キット
イチゴ
1000ppm　標準品メタノール溶液

３．方法
3-1.添加用標準液の調製
1000ppm　標準品メタノール溶液
↓
メタノールを用いて10ppmの添加用標準液を調製した。

3-2.測定試液の調製
農産物試料
↓
磨砕：農産物を細断し、ミキサーでペースト状にした。
↓
ペースト5ｇを 50mL遠沈管×３個にそれぞれ正確に量りとった。
↓
添加用標準液をそれぞれ下記の表のようにずつ添加した。
↓　　添加用標準液の濃度およびサンプル中の農薬濃度
↓

添加試料	添加用標準液調製濃度	ホモジネート中農薬濃度	抽出・希釈後濃度	添加量
	ppm	ppm	ppb	mL
A	10	1.50	29.41	0.75
B	10	1.02	20.00	0.51
C	10	0.75	14.71	0.38

↓
遠沈管のふたを閉め、よく振った。
↓
メタノール25mLを添加した。
↓
振とう機（120回/分)で30分間振とうした。
↓
綿球を詰めたシリンジでろ過した。
ろ液を標準品を添加した農産物抽出液(85%メタノール相当）とした。
↓
標準品を添加した農産物抽出液1mLをﾊﾞｲｱﾙ瓶にとり、7.5mLの蒸留水を
添加し、よく混和した。（8.5倍希釈）これを測定試液とした。

3-3.キットの調製
4℃で保管してあるキットを取り出し、30分間25℃に静置した。
↓
酵素標識物試薬に精製水6mLを添加、溶解して、酵素標識物試液とした。
標準試薬に10%メタノール　1.0mLを添加、溶解して標準試液とした。

付録２：自社による性能試験結果

3-4.アッセイ
試験管に酵素標識物試液と測定試液、酵素標識物試液と標準試液及び
酵素標識物試液と10%メタノールを等量混合して、混合試液とした。
↓
各混合試液を抗体プレートに100μL/well分注した。
↓
25℃　1時間静置した。
↓
吸引、洗浄３回実施した。
発色液を100μL/well分注した。
↓
発色反応　25℃　10分間静置した。
↓
反応停止
反応停止液100μL/well分注した。
↓
測定（450nm）　　測定機：スマートリーダー

４．結果

表5　添加回収試験

添加濃度　（ppm）	回収濃度(ppm)	回収率（%）	平均回収率（%）
1.50	1.92	127.8	120.5 ± 6.8
	1.79	119.3	
	1.72	114.4	
1.02	1.40	137.2	129.3 ± 7.6
	1.31	128.7	
	1.25	122.1	
0.75	0.94	125.7	112.3 ± 12.6
	0.83	110.4	
	0.76	100.7	

５．考察
イチゴのホモジネートにビテルタノールを添加した試料について、添加回収試験を行った。
結果は表5のとおり、回収率は112.3～129.3%と高めになる傾向があるが、許容範囲と考える。
なお、回収率の計算は、下記のとおりである。
回収率（%）＝（添加試料の回収濃度）／（添加濃度）×100

付録３：参考となるその他の文書やデータ等

１．技術の先進性について

技術の先進性、特許・実用新案等の申請・取得状況、論文発表、受賞歴等があれば記入して下さい。
技術の先進性 特開平１０－１８２６２０「ビテルタノール及びその類縁化合物のハプテン化合物、抗体および測定方法」

２．その他

環境モニタリングへの適用性、将来の発展性、今後の取組等を記入して下さい。
ビテルタノールは「PRTR 法対象物質」にリストアップされており、環境水での適応を確認するため申請するものです。